

[文章编号] 1000-4718(2007)12-2448-03

桂皮醛对 NIH3T3 细胞 c - Fos、c - Myc 表达的影响*

赵京霞¹, 李萍^{1△}, 黄启福², 刘欣¹, 盛巡¹, 梁代英¹
(¹北京市中医研究所, 北京 100010; ²北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的: 研究肉桂主要成分桂皮醛刺激 NIH3T3 细胞后 c - Fos、c - Myc 蛋白在不同时点表达的规律, 探讨桂皮醛促进 NIH3T3 细胞增殖的机制。方法: 采用 MTT 法观察不同浓度桂皮醛对 NIH3T3 细胞增殖的影响; 并采用免疫细胞化学法检测桂皮醛对 NIH3T3 细胞 c - Fos、c - Myc 蛋白表达的影响。结果: 桂皮醛浓度在 (8.8 × 10⁻²) - (8.8 × 10) μg/L 浓度范围内对 NIH3T3 细胞具有促增殖作用。当其浓度为 5.5 μg/L 时, 促增殖作用最显著。在此浓度下, 经桂皮醛刺激后, c - Fos 和 c - Myc 蛋白均在 2 h 开始表达, 3 h 时表达明显增加。结论: 桂皮醛可以上调 c - Fos、c - Myc 蛋白的表达, 提示桂皮醛促进细胞增殖可能与其能促进 c - Fos、c - Myc 快速表达有关。

[关键词] 桂皮醛; 细胞增殖; 蛋白质 c - Fos; 蛋白质 c - Myc; NIH3T3 细胞
[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Effects of cinnamyl aldehyde on c - Fos and c - Myc expression in NIH3T3 cells

ZHAO Jing - xia¹, LI Ping¹, HUANG Qi - fu², LIU Xin¹, SHENG Xun¹, LIANG Dai - ying¹

(¹ Beijing Institute of Chinese Medicine, Beijing 100010, China; ² Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China. E - mail: liping411@yahoo.com.cn)

[ABSTRACT] AIM: Cinnamyl aldehyde (CA) is one alcohol ingredient derived from Cinnamomum cassia, which is widely used in treating chronic skin wound in Chinese medicine with the curative effect of 'rescuing YANG'. The purpose of the present study was to investigate the expression of c - Fos, c - Myc proteins at different time points in NIH3T3 treated with CA and explore the possible mechanism of promoting cell proliferation by CA. METHODS: MTT assay was used for observing cell proliferation. Expression of c - Fos and c - Myc proteins in NIH3T3 cells were assessed by immunocytochemistry assay. RESULTS: The cell proliferation was promoted obviously when CA concentration was between 8.8 × 10⁻² μg/L and 8.8 × 10 μg/L. CA at concentration of 5.5 μg/L significantly induced expression of c - Fos, c - Myc proteins at 2 - 3 h after the stimulation compared with control group (P < 0.01). CONCLUSION: CA increases expression of c - Fos and c - Myc proteins, which may be one of mechanisms for CA to promote NIH3T3 cell proliferation.

[KEY WORDS] Cinnamyl aldehyde; Cell proliferation; Protein c - Fos; Protein c - Myc; NIH3T3 cells

原癌基因是与调控细胞增殖分化密切相关的基因, 参与了多种生长因子的信号转导, 将核外信号转变为基因表达信号, 通过对细胞内生长调控系统中多环节的作用而影响细胞生长、增殖和分化全过程。近年来发现部分原癌基因在组织再生、创伤愈合等过程中常被激活^[1]。早期基因 *c - myc* 和即刻早期基因 *c - fos* 都是编码核蛋白的癌基因。它们的产物具有转录调节作用、介导细胞由静止期向增殖期转化, 并在伤口愈合中起作用^[2]。桂皮醛是中药肉桂的主要成分, 肉桂作为“回阳生肌类”中药的代表药在治疗慢性皮肤溃疡愈合方面具有重要的作用, 但

其作用机制尚不清楚。本研究拟观察桂皮醛能否对 NIH3T3 成纤维细胞增殖产生影响, 并运用免疫细胞化学的方法结合半定量分析来测定桂皮醛作用后 NIH3T3 细胞 c - Fos、c - Myc 蛋白表达的变化, 从分子水平探讨桂皮醛促进成纤维细胞增殖的机制。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 主要试剂和仪器 DMEM 培养基 (Gibco, Invitrogen Corporation); 胎牛血清 (FBS, 天津 TBD); 胰蛋白酶 (北京中杉金桥生物技术有限公司); 乙二胺

[收稿日期] 2006-06-09 [修回日期] 2007-01-09

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30472258)

△通讯作者 Tel: 010-52176679; E-mail: liping411@yahoo.com.cn

四乙酸(EDTA,北京中杉金桥生物技术有限公司);磷酸盐缓冲液(PBS,福州迈新生物技术开发公司);四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma);甲醇(分析纯,北京化学试剂公司);丙酮(分析纯,北京化学试剂公司);TritonX-100(Sigma);兔抗 c-Fos 多克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);兔抗 c-Myc 多克隆抗体(武汉博士德生物工程公司);即用型快速免疫组化 MaxVision™ 试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司);DAB 显色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司);酶标仪(DigiscanSA1000,奥地利);多功能显微镜(BX51, Olympus, Japan);Image-pro plus 5.0 图像分析软件。

1.2 药物 桂皮醛(cinnamyl aldehyde, CA)标准品由药品生物制品检定所提供。

1.3 细胞 NIH3T3 小鼠成纤维细胞瘤细胞株购于协和医科大学细胞中心。

2 方法

2.1 细胞增殖的检测 将 NIH3T3 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 调整细胞浓度至 2×10^7 cells/L,接种至 96 孔培养板,每孔 100 μ L。5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后,加入无血清 DMEM 稀释的桂皮醛:桂皮醛终浓度为 5.6×10^3 μ g/L、 1.4×10^3 μ g/L、 3.5×10^2 μ g/L、 8.8×10 μ g/L、 2.2×10 μ g/L、 5.5 μ g/L、 1.4 μ g/L、 3.5×10^{-1} μ g/L、 8.8×10^{-2} μ g/L;同时设立无细胞空白对照组(只加入无血清 DMEM)、无细胞药物对照组(无血清 DMEM 稀释的各浓度药物)和细胞对照组(只加入无血清 DMEM),均设 5 个复孔。培养 24 h 后,加入 MTT,每孔 20 μ L。在 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中继续培养 4 h 后,加入 100 μ L DMSO,轻轻振荡 10 min 后,用酶标仪在 570 nm 波长下,测 MTT 分光光度值(A 值反映细胞情况)。实验重复 3 次。

2.2 c-Fos、c-Myc 免疫细胞化学检测 实验前 NIH3T3 细胞用 0.125% 胰蛋白酶消化,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基吹打成细胞悬液,以 5×10^4 cells/well 的密度接种于预先放有消毒盖玻片的 12 孔培养板内,置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中孵育 24 h 后,换用无血清 DMEM 培养基继续培养 24 h。桂皮醛组加入无血清培养基稀释的药物(增殖检测筛选的有效浓度:5.5 μ g/L),细胞对照组为相应的无血清 DMEM 培养基。分别在加药后 0 h、1 h、2 h、3 h 取出细胞爬片,用固定液(甲醇:丙酮 1:1)固定 10 min,干燥数小时后用免疫细胞化学法分别检测药物对 c-Fos、c-Myc 蛋白表达的影响。实验设立阴性对照,不加 I 抗。免疫细胞化学玻片采用 IPP 图像分析系统进行半定量分析,每组 5 张玻片,每张玻片上随机选取 3 个视野,各指标以平均吸光度(A)表示。

3 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 11.0

软件进行统计学处理,多组间均数比较采用单因素方差分析。

结 果

1 桂皮醛对 NIH3T3 细胞增殖的作用

桂皮醛对 NIH3T3 细胞增殖的作用见表 1。桂皮醛浓度大于 3.5×10^2 μ g/L 时对 NIH3T3 细胞的生长具有一定的抑制作用;在 (8.8×10^{-2}) μ g/L - (8.8×10) μ g/L 浓度范围内对 NIH3T3 细胞具有促增殖作用,与细胞对照组比较差异显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其中桂皮醛终浓度为 5.5 μ g/L 时,促增殖作用最显著。

表 1 桂皮醛对 NIH3T3 细胞增殖的浓度效应

Tab 1 Effects of cinnamyl aldehyde on NIH3T3 proliferation (A. $\bar{x} \pm s$. n=5)

Group	Concentration(μ g/L)	A value
Control	0	0.611 \pm 0.012
Cinnamyl aldehyde	5.6×10^3	0.459 \pm 0.012**
	1.4×10^3	0.548 \pm 0.017*
	3.5×10^2	0.629 \pm 0.012
	8.8 $\times 10$	0.656 \pm 0.021
	2.2×10	0.691 \pm 0.012*
	5.5	0.704 \pm 0.016**
	1.4	0.677 \pm 0.039**
	3.5×10^{-1}	0.656 \pm 0.039*
	8.8×10^{-2}	0.665 \pm 0.033*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

2 桂皮醛对 NIH3T3 细胞 c-Fos、c-Myc 蛋白表达的影响

c-Fos 蛋白主要为核表达。图像经半定量分析,结果见表 2。桂皮醛作用 NIH3T3 细胞 2 h 后,阳性细胞数增多,胞核染色加深。经图像分析,桂皮醛组 c-Fos 表达在作用 2 h 增加,与对照组比较均有显著差异;作用 3 h 时,桂皮醛组 c-Fos 表达仍明显高于对照组。

c-Myc 蛋白主要为胞浆表达。图像经半定量分析,结果见表 3。桂皮醛作用 NIH3T3 细胞 2 h 后,胞浆染色加深,c-Myc 表达量增加明显;3 h 时,胞浆染色继续加深,与对照组比较差异显著。

表 2 桂皮醛对 NIH3T3 细胞 c-Fos 蛋白表达的影响

Tab 2 The effects of CA on the expression of c-Fos protein in NIH3T3 cells(A. $\bar{x} \pm s$. n=5)

Group	c-Fos protein			
	0 h	1 h	2 h	3 h
Control	0.146 \pm 0.012	0.151 \pm 0.011	0.150 \pm 0.008	0.154 \pm 0.012
CA	0.146 \pm 0.007	0.151 \pm 0.010	0.220 \pm 0.015**	0.246 \pm 0.016**

** $P < 0.01$ vs control group. CA: cinnamyl aldehyde.

表3 桂皮醛对 NIH3T3 细胞 c - Myc 蛋白表达的时间 - 效应影响

Tab 3 The effects of CA on the expression of c - Myc protein in NIH3T3 cells (A. $\bar{x} \pm s$. n = 5)

Group	c - Myc protein			
	0 h	1 h	2 h	3 h
Control	0.175 ± 0.013	0.179 ± 0.013	0.183 ± 0.019	0.180 ± 0.011
CA	0.177 ± 0.010	0.180 ± 0.008	0.226 ± 0.015 **	0.284 ± 0.016 **

** P < 0.01 vs control group. CA; cinnamyl aldehyde.

讨 论

细胞外信号可以通过多条信号转导途径以引起细胞应答。而细胞对外界增殖信号响应的一个共同环节是激活原癌基因编码的通用转录因子如 c - Fos、c - Jun、c - Myc 等。早期基因 c - myc 和即刻早期基因 c - fos 都是编码核蛋白的癌基因。它们的产物具有转录调节作用、介导细胞由静止期向增殖期转化,并在伤口愈合中起作用^[2]。

原癌基因 c - fos 在细胞受外界刺激后,能迅速表达,然后磷酸化,进入核内激活转录蛋白,这种核磷蛋白 (FOS) 被认为在外界刺激与转录偶联的信号转导转化过程中起着核内第 3 信使的作用^[3]。c - fos 表达的蛋白 Fos,是在细胞核内起作用的蛋白质。它是一种反式作用因子,不直接与 DNA 结合,而是与一些转录因子如 c - jun 表达的癌蛋白结合形成活性蛋白 - 1 (AP - 1) 而起作用, AP - 1 可以识别基因序列中的 TRE 位点并可以启动如 bFGF、TGF、c - myc、胶原酶、内皮素 - 1 等基因的转录,从而调节细胞的生长与分化,间接促进创伤修复^[4-6]。

c - myc 是较早发现的癌基因,是控制细胞生长的基因之一^[7,8],是 myc 癌基因家族中最重要的一员,其编码的产物 c - Myc 蛋白属核反式调控因子,与 DNA 结合,作用于基因的调控区,促进基因的表达,启动一系列与增殖有关的基因,促进细胞的增殖、分化。各种刺激通过某种未知途径激活 c - Myc,而 c - Myc 作为转录因子促进 cyclin D、E2F 等 G₁ - S 有关的许多基因表达,进而促使细胞由 G₀ 期进入 S 期,尤其是 G₀ 期进入 G₁ 期,因此也被称为“细胞有丝分裂的中介物”^[2]。

本实验结果显示桂皮醛浓度在 (8.8 × 10) μg/L - (8.8 × 10⁻²) μg/L 浓度范围内对 NIH3T3 细胞具有促增殖作用,当桂皮醛浓度为 5.5 μg/L 时,其促增殖作用最显著。在此浓度下,桂皮醛对 c - Fos、c - Myc 的表达均有明显的促进作用。桂皮醛组 c - Fos 和 c - Myc 表达均在药物作用 2 h 后增加,3 h 时持续增加,与对照组相比差异显著,提示桂皮醛促进细胞增殖与其能促进 c - Fos、c - Myc 快速大量表达有关。c - Fos 与 c - Jun 可形成 AP - 1 从而启动下游因子基因如 bFGF 和 TGF 基因转录和翻译,提

高胞内 bFGF 的表达和蛋白含量,而 bFGF 与受体结合可诱导胞内酪氨酸激酶磷酸化,通过 MAPK 信号通路,促进 c - myc 基因转录和翻译,启动成纤维细胞进入 S 期,加速细胞增殖^[9]。

此外,实验中我们还发现桂皮醛能显著提高 NIH3T3 细胞 bFGF 蛋白的表达,bFGF 在胞内合成之后通常是以旁分泌或者自分泌的形式出现在胞外。因此,我们观察了外源性 bFGF 对 NIH3T3 细胞 c - Fos 蛋白表达的影响,发现外源性 bFGF 也可促进 c - Fos 表达,同时诱导 c - Myc 表达。Major 等^[10] 研究认为,bFGF 调控 c - Fos 可能是通过 bFGF 与其膜受体结合后,通过激活酪氨酸激酶来实现的。其细胞内的信号转导通路包括 SH3 与 Src 位点,进一步涉及 MAPKs 通路中的 P42/44 控制区,最终靠增加 c - fos 与 c - jun 等早期即刻基因 mRNA 水平将信号转导入核内,从而发挥一系列生物学效应。由于细胞间生物信号转导的复杂性,关于 c - Fos、bFGF 和 c - Myc 在体内的相互调控关系仍有待进一步探讨。

[参 考 文 献]

- [1] 胡振富,罗力生,罗盛康. 病理性瘢痕中 c - myc、c - fos 和 ras 原癌基因表达的实验研究 [J]. 中华整形外科杂志,2002,18(3):165 - 167.
- [2] 毋巨龙,李荟元,李世荣. TGF - β₁ 对增生性瘢痕成纤维细胞中 c - myc 和 c - fos 表达及胶原分泌的影响 [J]. 第三军医大学学报,2002,24(5):594 - 596.
- [3] Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, et al. Oncogenes and signal transduction [J]. Cell,1991,64(2):281 - 302.
- [4] 顾小曼,付小兵,杨银辉,等. 转录因子 c - fos mRNA 及其蛋白在大鼠烧伤创面的表达 [J]. 中华烧伤杂志,2000,16(3):180 - 182.
- [5] Kim J, Lin JJ, Xu RH, et al. Mesoderm induction by heterodimeric AP - 1 (c - jun and c - fos) and its involvement in mesoderm formation through the embryonic fibroblast growth factor/xbra autocatalytic loop during the early development of Xenopus embryos [J]. J Biol Chem, 1998,273(3):1542 - 1550.
- [6] 江毅,赖西南,王丽丽. P 物质对培养成纤维细胞 c - fos、c - jun 表达的影响 [J]. 口腔医学,2004,24(1):1 - 4.
- [7] Sun LQ, Cairns MG, Gerlach WL, et al. Suppression of smooth muscle cell proliferation by a c - myc RNA - cleaving deoxyribozyme [J]. J Biol Chem,1999,274(24):17236 - 17241.
- [8] 张鹏辉,邹琳,涂植光. bHLH 家族基因对 hTERT 启动子转录活性的调节研究 [J]. 中国病理生理杂志,2006,22(1):164 - 167.
- [9] 陈伟,付小兵,孙同柱,等. 胎儿和成人皮肤组织中 bFGF、c - fos 和 c - myc 基因转录与翻译的变化及其与创面无瘢痕愈合的关系 [J]. 中国危重病急救医学,2002,14(2):96 - 99.
- [10] Major TC, Keiser JA. Inhibition of cell growth: Effects of the tyrosine kinase inhibitor CGP53716 [J]. Pharmacol Exp Ther,1997,283(1):402 - 410.